

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2005 年 8 月 25 日 (25.08.2005)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2005/078415 A1

- (51) 国際特許分類⁷: G01N 21/55, 21/27
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2005/002045
- (22) 国際出願日: 2005 年 2 月 10 日 (10.02.2005)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願2004-036424 2004 年 2 月 13 日 (13.02.2004) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): オムロン株式会社 (OMRON CORPORATION) [JP/JP]; 〒6008530 京都府京都市下京区塩小路通堀川東入南不動堂町 8 0 1 番地 Kyoto (JP).

市下京区塩小路通堀川東入南不動堂町 8 0 1 番地 オムロン株式会社内 Kyoto (JP). 松下 智彦 (MAT-SUSHITA, Tomohiko) [JP/JP]; 〒6008530 京都府京都市下京区塩小路通堀川東入南不動堂町 8 0 1 番地 オムロン株式会社内 Kyoto (JP). 青山 茂 (AOYAMA, Shigeru) [JP/JP]; 〒6190224 京都府相楽郡木津町兜台 7 丁目 1 3-1 5 Kyoto (JP). 乗岡 茂巳 (NORIOKA, Shigemi) [JP/JP]; 〒5670048 大阪府茨木市北春日丘 四丁目 9 番 1 号 Osaka (JP). 和沢 鉄一 (WAZAWA, Tetsuichi) [JP/JP]; 〒5650873 大阪府吹田市藤白台 1-1-D 3 0-1 0 5 千里藤白台リッツハウス D 3 0 Osaka (JP).

- (74) 代理人: 中野 雅房 (NAKANO, Masayoshi); 〒5400012 大阪府大阪市中央区谷町 1 丁目 3 番 5 号 オグラ天満橋ビル Osaka (JP).

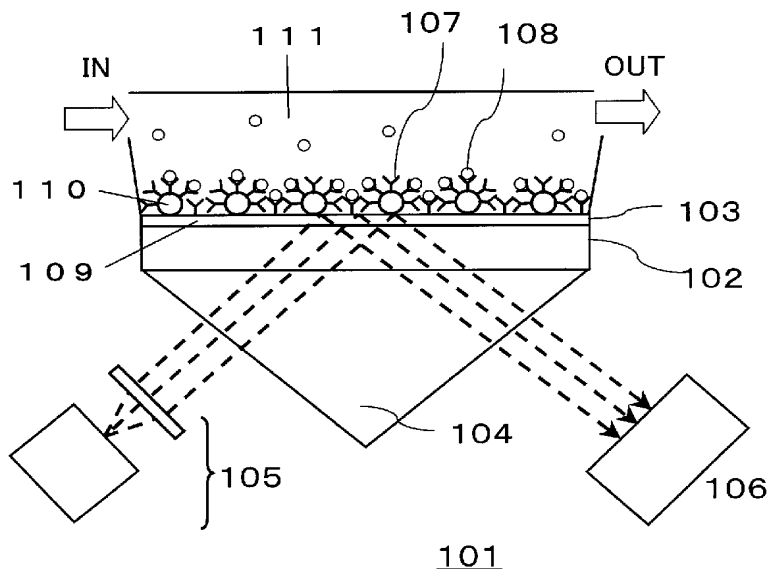
- (72) 発明者; および
(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 西川 武男 (NISHIKAWA, Takeo) [JP/JP]; 〒6008530 京都府京都

- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM,

[続葉有]

(54) Title: SURFACE PLASMON RESONANCE SENSOR

(54) 発明の名称: 表面プラズモン共鳴センサー



(57) Abstract: A surface plasmon resonance sensor comprising a chip having a substrate (102) and a metal layer (103), a prism (104), an optical system (105) becoming a light source, and a photodetector (106), wherein the metal layer (103) consists of a flat part (109) in the form of a thin film, and protrusions consisting of fine metal particles (110) or the like arranged at intervals. When light impinges on such a metal layer (103), a resonance angle caused by the flat part (109) and each protrusion is attained. Variation in the refractive index of a medium touching the metal layer can be detected from the resonance angle.

[続葉有]

WO 2005/078415 A1



DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

- 国際調査報告書
- 補正書・説明書

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU,

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(57) 要約: 基板102および金属層103を備えたチップと、プリズム104と、光源となる光学系105、光検出器106とを備えた表面プラズモン共鳴センサーにおいて、金属層103を、薄膜状に形成された平坦部109と、互いに間隔を空けて配置された金属微粒子110などからなる凸部とから構成する。このような構成の金属層103に対して光を入射した場合、平坦部109および凸部の各々に起因した共鳴角が得られる。この共鳴角からは、金属層が接している媒質の屈折率変化を検出することができる。

明 細 書

表面プラズモン共鳴センサー

技術分野

- [0001] 本発明は、表面プラズモン共鳴 (SPR: surface plasmon resonance) センサーに関し、より詳細には、タンパク質やDNAといった生体分子の相互作用を検出するのに適した表面プラズモン共鳴センサーに関する。

背景技術

- [0002] 近年、生体分子の相互作用の有無または程度を検出するためのセンサーとして、表面プラズモン共鳴センサーが用いられている。

図1に、従来の表面プラズモン共鳴センサー1を示す。表面プラズモン共鳴センサー1は、ガラスなどからなる基板2と、基板2上に形成された金属薄膜3と、基板2の金属薄膜3が形成されていない側に配置されたプリズム4と、金属薄膜3と基板2との界面に対して種々の角度で光を入射させることができる光学系5と、金属薄膜3と基板2との界面で反射した光の強度を測定する光検出器6とを備える。金属薄膜3は、試料溶液と接しており、試料溶液中の抗原などのリガンド8は、金属薄膜3の表面に固定化された抗体などの受容体7と相互作用する。

- [0003] 光学系5からの光を、金属薄膜3と基板2との界面で全反射するように、プリズム4に入射させると、金属薄膜3の表面に、電界分布をもつエバネッセント波が生じる。エバネッセント光の波数および周波数が、表面プラズモンの波数および周波数と一致するとき、両者は共鳴し、入射光のエネルギーが表面プラズモンに移行するので、反射光が減少する。

ここで、共鳴が起こるための入射角 (共鳴角) は、金属薄膜3の表面の屈折率に依存する。金属薄膜3に固定された受容体7と試料溶液中のリガンド8とが相互作用した場合、表面の屈折率が変わるため、共鳴角が変化する。この角度変化を測定することで、生体分子の相互作用を検出する。図2に、表面プラズモン共鳴センサー1により受容体7とリガンド8との反応前後に測定した反射率の変化の例を示す。

- [0004] 一方で、金属薄膜ではなく金属微粒子を膜状に固定した基板に対して光を照射し

、金属微粒子を透過した光の吸光度を測定することによって、金属微粒子表面近傍の屈折率の変化を検出するようにした局在プラズモン共鳴センサーも提案されている（特許文献1）。

[0005] 特許文献1:特許第3452837号公報

発明の開示

発明が解決しようとする課題

[0006] しかしながら、図1に示す表面プラズモン共鳴センサー1においては、金属薄膜から200nm程度の距離までの屈折率変化に影響されるため、金属薄膜に固定された生体分子の相互作用に基づく屈折率の変化のみならず、溶液部の濃度、pH、温度などの変化に基づく屈折率の変化もノイズとして検出されてしまうという問題点があった。

また、特許文献1に開示されている局在プラズモン共鳴センサーは、金属薄膜の代わりに金属微粒子膜を用いることで、発生する電場を金属微粒子表面近傍に局在化させ、溶液部における屈折率の変化の影響を小さくしているが、溶液部の影響を排除するものではなく、測定結果に対して溶液部の変化がどの程度影響しているのかが分からないという課題があった。

課題を解決するための手段

[0007] 本発明は、上述のような技術的課題に鑑みてなされたものであり、金属表面での分子の相互作用に基づく屈折率の変化および溶媒部での変化に基づく屈折率の変化をそれぞれ検出することを目的としている。

[0008] 本発明に係る表面プラズモン共鳴センサー用チップは、透光性の基板と、表面に凹部又は凸部、及び前記凹部又は凸部間に位置する平坦部を有し、前記基板の表面を覆うように形成された金属層とを備えていることを特徴とする。

[0009] 本発明に係る表面プラズモン共鳴センサー用チップのある実施態様は、前記基板が平坦な表面を有する基板であり、前記凸部が前記平坦部である金属薄膜の上に互いに間隔を空けて固定化された複数の金属微粒子であることを特徴とする。

[0010] 本発明に係る表面プラズモン共鳴センサー用チップの別な実施態様は、前記基板は平坦な表面を有する基板であり、前記凹部又は凸部は前記金属層である金属薄

膜に互いに間隔を空けて形成された複数の微小な凹部又は凸部であり、前記凹部は前記金属薄膜を貫通していないことを特徴とする。

[0011] 本発明に係る表面プラズモン共鳴センサー用チップのさらに別な実施態様は、前記基板の片側表面には、間隔を空けて複数の微小凸部または微小凹部が形成されており、前記金属層は、前記微小凸部または微小凹部の形状を反映するように、前記基板の片側表面上に形成されていることを特徴とする。

[0012] 本発明に係る表面プラズモン共鳴センサー用チップのさらに別な実施態様は、前記金属層の材質が金または銀であることを特徴とする。

[0013] 本発明に係る表面プラズモン共鳴センサー用チップの製造方法は、基板の片側表面にスパッタリングまたは蒸着により金属薄膜を形成する工程と、前記金属薄膜の表面を化学修飾する工程と、前記化学修飾した基板を金属微粒子の溶液に浸漬する工程とを含むことを特徴とする。

[0014] 本発明に係る表面プラズモン共鳴センサー用チップの製造方法は、基板の片側表面をアミノシランカップリング剤の溶液に浸漬する工程と、前記基板を金属微粒子の溶液に浸漬する工程と、前記基板を洗浄する工程と、前記片側表面にスパッタリングまたは蒸着により金属薄膜を形成する工程とを含むことを特徴とする。

[0015] 本発明に係る表面プラズモン共鳴センサーは、本発明に係る表面プラズモン共鳴センサー用チップと、前記チップの前記金属層が形成されていない側に配置されたプリズムと、前記チップに前記プリズムを介して光を照射する光源と、前記金属層による光の反射率を測定する光検出器とを備えたことを特徴とする。

[0016] 本発明に係る生体分子の測定方法は、本発明に係る表面プラズモン共鳴センサーチップに対して光学系から光を照射し、前記チップの金属層と基板との界面で光を全反射させ、光検出器で反射光の強度を測定する生体分子の測定方法であって、前記照射光の周波数変化に対する前記反射光の強度の変化により、生体分子の相互作用の有無または程度を測定することを特徴とする。

[0017] 本発明に係る屈折率変化の検出方法は、本発明に係る表面プラズモン共鳴センサーチップに対して光学系から光を照射し、前記チップの金属層と基板との界面で光を全反射させ、光検出器で反射光の強度を測定する屈折率変化の検出方法であつ

て、前記反射光の共鳴角の変化を測定することにより、前記金属層表面での分子の相互作用に基づく屈折率の変化と、前記金属層近傍の溶媒との相互作用に基づく屈折率の変化をそれぞれ検出することを特徴とする。

発明の効果

- [0018] 本発明の表面プラズモン共鳴センサーは、プリズムの一面に形成される金属層が、薄膜状に形成された平坦部と、互いに間隔を空けて配置された金属微粒子などからなる凸部とからなっており、このような構成の金属層に対して光を入射した場合、平坦部および凸部の各々に起因した共鳴角が得られる。この特徴を利用することで、金属表面での分子の相互作用に基づく屈折率の変化および溶媒部での変化に基づく屈折率の変化を、それぞれ検出することができる。

図面の簡単な説明

- [0019] [図1]図1は、従来の表面プラズモン共鳴センサーの概略側面図である。
- [図2]図2は、従来の表面プラズモン共鳴センサーにおける、入射光の入射角度と反射率との関係を示すグラフである。
- [図3]図3は、本発明の第1の実施形態にかかる表面プラズモン共鳴センサーの概略側面図である。
- [図4]図4は、金属層の表面に生じる電場を概念的に示す図である。
- [図5]図5は、表面プラズモンと入射光の分散関係を示すグラフである。
- [図6]図6は、ハイブリッドモードの表面プラズモンと入射光の分散関係を示すグラフである。
- [図7]図7は、本発明の実施形態において測定される反射率の測定結果を示すグラフである。
- [図8]図8は、図3の表面プラズモン共鳴センサーの一部を拡大した図である。
- [図9]図9は、本発明の第2の実施形態にかかる表面プラズモン共鳴センサーの概略側面図である。
- [図10]図10は、本発明の第3の実施形態にかかる表面プラズモン共鳴センサーの概略側面図である。

符号の説明

- [0020] 1、101、201、301 表面プラズモン共鳴センサー
2、102 基板
3、103 金属層
4、104 プリズム
5、105 光学系
6、106 光検出器
7、107 受容体
8、108 リガンド
109 平坦部
110 金属微粒子
111 試料溶液

発明を実施するための最良の形態

- [0021] 以下、図面を参照しながら、本発明の好適な実施形態について説明する。

実施例 1

- [0022] 図3は、本発明の第1の実施形態による表面プラズモン共鳴センサー101の概略側面図を示す。表面プラズモン共鳴センサー101は、ガラスなどからなる基板102と、基板102上に形成された金属層103と、基板102の金属層103が形成されていない側に配置されたプリズム104と、金属層103と基板102との界面に対して光を入射させる光学系105と、金属層103と基板102との界面で反射した光の強度を測定する光検出器106とを備える。光学系105は、ある波長の光を種々の入射角度で入射させるものであっても良いし、種々の波長の光を一定の入射角度で入射させるものであっても良い。

- [0023] 金属層103は、本実施形態において、薄膜状に形成された平坦部109と、互いに間隔を空けて配置された金属微粒子110とから構成されており、平坦部109は隣接する金属微粒子110間に露出している。平坦部109の厚みは、好ましくは、20〜60 nmであり、金属微粒子110の径は、好ましくは、20〜150nmである。金属層103は、代表的に、金または銀からなるがこれらに限定されない。金属層103の表面には、抗体などの受容体107が固定化されている。金属層103は、抗原などのリガンド108

を含む試料溶液111と接しており、リガンド108は、金属層103表面の受容体107と相互作用する。

[0024] このような構成において、光学系105からの光を、金属層103と基板102との界面で全反射するように、プリズム104に入射させると、金属層103の表面に、エバネッセント波が生じる。エバネッセント光の波数および周波数が、表面プラズモンの波数および周波数と一致するとき、両者は共鳴し、反射光が減少する。この反射光の反射率を光検出器106により測定する。

[0025] ここで、金属層103の表面で励起される表面プラズモンの電場について説明する。図4は、金属層103の表面に発生する電場の様子を両矢印により概念的に示す図である。図4(a)は、金属微粒子110の表面近傍(金属微粒子の半径(数十nm)程度の範囲)に局在化された電場(局在モード)を示す。図4(b)は、平坦部109の表面から数百nm程度の範囲に存在する電場(伝播モード)を示す。すなわち、局在モードは金属微粒子110に起因し、伝播モードは平坦部109に起因するものであり、図4(a)(b)では両モードを別々に表わしているが、両モードは同時に生成して混在している。図5は、表面プラズモンの各モードと入射光との関係を示すグラフであり、縦軸は角周波数(ω)、横軸は波数($k = 2\pi / \lambda$ 。ただし、 λ は波長)を示す。図5(a)は局在モードの表面プラズモンと入射光との関係を示し、図5(b)は伝播モードの表面プラズモンと入射光との関係を示しており、両モードとも入射光と一点で共鳴することが分かる。

[0026] 本実施形態のように、局在モードと伝播モードが混在する場合、表面プラズモンのモードは、図5(c)に示すような分散関数で表わされるハイブリッドモード(a-d、c-b)となる。ただし、図5(c)においてQは局在モードと伝播モードとの交点を表わしており、c-Q-dは局在モード、a-P-Q-bは伝播モードである。このようなハイブリッドモードと入射光との関係を表すグラフを図6に示す。図6から明らかなように、ハイブリッドモードを形成した表面プラズモンは、入射光と二点(A、B)で共鳴する。ただし、入射光は、基板102の屈折率を n 、光の真空中での速度を c とすると、 $\omega = (c/n)k$ で表わされるものであり、基板102への入射角が一定の場合、基板102に入射する光の波長がA点に対応する短い側の共鳴波長の場合には、金属微粒子110の近傍に

において局在型の共鳴が発生し、基板102に入射する光の波長がB点に対応する長い側の共鳴波長の場合には、平坦部109による伝播型の共鳴が発生する。

[0027] しかし、種々の波長の光を一定の入射角度で入射させて反射率を測定した場合、図7(a)に示すように、2つの共鳴ピーク(A、B)が得られる。点線は、受容体107とリガンド108が反応する前の測定結果を、実線は、反応後の測定結果を示す。ピークAは、局在モードの電場に起因するもので、図6の点Aにおける共鳴に対応する。ピークBは、伝播モードの電場に起因するもので、図6の点Bにおける共鳴に対応する。

[0028] また、異なる2つの波長の光を種々の入射角度で入射させて反射率を測定した場合は、図7(b)に示すように、それぞれ1つの共鳴ピーク(A、B)が得られる。点線は、受容体107とリガンド108が反応する前の測定結果を、実線は、反応後の測定結果を示す。短い波長(波長 λ_1)のピークAは、局在モードの電場に起因するもので、図6の点Aにおける共鳴に対応する。長い波長(波長 λ_2)のピークBは、伝播モードの電場に起因するもので、図6の点Bにおける共鳴に対応する。

[0029] 図8に示すように、種々の波長の光を一定の入射角度で入射させ、反応の前後で反射率の変化を測定した場合(図7(a))に得られる共鳴ピークの変化($\Delta\lambda_1$ 、 $\Delta\lambda_2$)は、それぞれ、金属層103表面における受容体107とリガンド108との相互作用に基づく屈折率の変化(Δn_1)および溶媒部(試料溶液111)での屈折率の変化(Δn_2)の両方に影響を受けている。 $\Delta\lambda_1$ および $\Delta\lambda_2$ を、それぞれ Δn_1 、 Δn_2 の関数として求めれば、二式を解くことで Δn_1 および Δn_2 を算出することができる。よって、溶媒部の変化を除いた金属層表面のみの変化を厳密に測定することができる。

[0030] 具体的にいうと、共鳴ピークの変化 $\Delta\lambda_1$ は、金属膜近傍の屈折率変化 Δn_1 と溶媒部の屈折率変化 Δn_2 によって決まるので、金属微粒子層の厚みが既知であるとすれば、

$$\Delta\lambda_1 = F(\Delta n_1, \Delta n_2) \quad \dots(1)$$

という関数で表わされる。同様に、共鳴ピークの変化 $\Delta\lambda_2$ も、屈折率変化 Δn_1 及び Δn_2 によって決まるので、

$$\Delta\lambda_2 = G(\Delta n_1, \Delta n_2) \quad \dots(2)$$

という関数で表わされる。ここで、関数F及びGは、予め実験的に求めておけばよい。ハイブリッドモードでは、この2つの波長変化 $\Delta \lambda 1$ 、 $\Delta \lambda 2$ を測定することができるので、上記(1)式、(2)式を解くことによって、波長変化 $\Delta \lambda 1$ 、 $\Delta \lambda 2$ から屈折率変化 $\Delta n 1$ 、 $\Delta n 2$ を求めることができる。

[0031] 続いて、本実施形態で用いられる金属層103の製法について説明する。

第1の製法は、ガラスや樹脂からなる基板を洗浄する工程、該基板上に蒸着またはスパッタリングにより金薄膜を形成する工程、該金属薄膜上にジチオール(例えば、1、10-デカンジチオール)の単分子層を形成する工程、および該基板を金微粒子の溶液に浸漬する工程を含む。本製法によれば、ジチオールを介して金薄膜に金微粒子を固定化することができる。

[0032] 第2の製法は、ガラスや樹脂からなる基板を洗浄する工程、該基板の片側表面をアミノシランカップリング剤(例えば、3-アミノプロピルトリメトキシシラン)の溶液に浸漬する工程、該片側表面を金微粒子の溶液に浸漬する工程、該基板を洗浄する工程と、該片側表面にスパッタリングまたは蒸着により金属薄膜を形成する工程を含む。本製法では、基板上にまず金粒子を固定化し、次いで金粒子の間に金薄膜からなる平坦部109を形成する。

実施例 2

[0033] 図9は、本発明の第2の実施形態による表面プラズモン共鳴センサー201の概略側面図を示す。本実施形態は、金属層103の構造において第1の実施形態と異なる。本実施形態における金属層103は、基板102の平坦な面上に金属薄膜を形成し、該金属薄膜上にエッチングなどにより微小凹凸を形成したものである。ただし、凹部は金属薄膜を貫通しないように形成される。このような金属層103を用いた場合においても、凹部または凸部近傍に電場が局在化するので、第1の実施形態と同様の効果を得ることができる。

なお、微小凹凸の形状および配置間隔は、図9に示されるものに限らず、適宜選択され得る。

実施例 3

[0034] 図10は、本発明の第3の実施形態による表面プラズモン共鳴センサー301の概略

側面図を示す。本実施形態は、基板102および金属層103の構造において第1の実施形態と異なる。本実施形態においては、基板102の表面に、間隔を空けて複数の微小凸部または微小凹部が形成されており、該微小凸部または微小凹部の形状を反映するように、基板102の上に金属層103が形成されている。このような金属層103を用いた場合においても、凹部または凸部近傍に電場が局在化するので、第1の実施形態と同様の効果を得ることができる。

[0035] 本実施形態で用いられる、表面に微小凹凸が形成された基板102は、金属微粒子やタンパク質などの生体分子の型を取ることで作成および複製することができる。

産業上の利用可能性

[0036] 本発明に従った表面プラズモン共鳴センサーは、抗原抗体反応における相互作用の有無および程度の検出に有用であることはもちろん、種々の生化学反応の分析に応用することが可能である。

請求の範囲

- [1] 透光性の基板と、
表面上に凹部又は凸部、及び前記凹部又は凸部間に位置する平坦部を有し、前記基板の表面を覆うように形成された金属層と
を備えた、表面プラズモン共鳴センサー用チップ。
- [2] 前記基板は平坦な表面を有する基板であり、前記凸部は前記平坦部である金属薄膜の上に互いに間隔を空けて固定化された複数の金属微粒子であることを特徴とする、請求項1に記載の表面プラズモン共鳴センサー用チップ。
- [3] 前記基板は平坦な表面を有する基板であり、前記凹部又は凸部は前記金属層である金属薄膜に互いに間隔を空けて形成された複数の微小な凹部又は凸部であり、前記凹部は前記金属薄膜を貫通していないことを特徴とする、請求項1に記載の表面プラズモン共鳴センサー用チップ。
- [4] 前記基板の片側表面には、間隔を空けて複数の微小凸部または微小凹部が形成されており、前記金属層は、前記微小凸部または微小凹部の形状を反映するように、前記基板の片側表面上に形成されていることを特徴とする、請求項1に記載の表面プラズモン共鳴センサー用チップ。
- [5] 前記金属層の材質が、金または銀である、請求項1に記載の表面プラズモン共鳴センサー用チップ。
- [6] 基板の片側表面にスパッタリングまたは蒸着により金属薄膜を形成する工程と、
前記金属薄膜の表面を化学修飾する工程と、
前記化学修飾した基板を金属微粒子の溶液に浸漬する工程と、
を含む、表面プラズモン共鳴センサー用チップの製造方法。
- [7] 基板の片側表面をアミノシランカップリング剤の溶液に浸漬する工程と、
前記基板を金属微粒子の溶液に浸漬する工程と、
前記基板を洗浄する工程と、
前記片側表面にスパッタリングまたは蒸着により金属薄膜を形成する工程と、
を含む、表面プラズモン共鳴センサー用チップの製造方法。
- [8] 請求項1～5のいずれか1項に記載の表面プラズモン共鳴センサー用チップと、前

記チップの前記金属層が形成されていない側に配置されたプリズムと、前記チップに前記プリズムを介して光を照射する光源と、前記金属層による光の反射率を測定する光検出器とを備えた表面プラズモン共鳴センサー。

- [9] 請求項1〜5に記載の表面プラズモン共鳴センサーチップに対して光学系から光を照射し、前記チップの金属層と基板との界面で光を全反射させ、光検出器で反射光の強度を測定する生体分子の測定方法であって、

前記照射光の周波数変化に対する前記反射光の強度の変化により、生体分子の相互作用の有無または程度を測定することを特徴とする生体分子の測定方法。

- [10] 請求項1〜5に記載の表面プラズモン共鳴センサーチップに対して光学系から光を照射し、前記チップの金属層と基板との界面で光を全反射させ、光検出器で反射光の強度を測定する屈折率変化の検出方法であって、

前記反射光の共鳴角の変化を測定することにより、前記金属層表面での分子の相互作用に基づく屈折率の変化と、前記金属層近傍の溶媒との相互作用に基づく屈折率の変化をそれぞれ検出する屈折率変化の検出方法。

補正書の請求の範囲

[2005年6月10日(10.06.05)国際事務局受理：出願当初の請求の範囲

1、9及び10は補正された；他の請求の範囲は変更なし。(2頁)]

1. (補正後)透光性の基板と、

表面に凹部又は凸部、及び前記凹部又は凸部間に位置する平坦部を有し、前記基板の表面を覆うように形成された金属層とを備え、

前記凹部の深さ及び幅、もしくは前記凸部の高さ及び幅は、20nm以上150nm以下である、

表面プラズモン共鳴センサー用チップ。

2. 前記基板は平坦な表面を有する基板であり、前記凸部は前記平坦部である金属薄膜の上に互いに間隔を空けて固定化された複数の金属微粒子であることを特徴とする、請求項1に記載の表面プラズモン共鳴センサー用チップ。

3. 前記基板は平坦な表面を有する基板であり、前記凹部又は凸部は前記金属層である金属薄膜に互いに間隔を空けて形成された複数の微小な凹部又は凸部であり、前記凹部は前記金属薄膜を貫通していないことを特徴とする、請求項1に記載の表面プラズモン共鳴センサー用チップ。

4. 前記基板の片側表面には、間隔を空けて複数の微小凸部または微小凹部が形成されており、前記金属層は、前記微小凸部または微小凹部の形状を反映するように、前記基板の片側表面上に形成されていることを特徴とする、請求項1に記載の表面プラズモン共鳴センサー用チップ。

5. 前記金属層の材質が、金または銀である、請求項1に記載の表面プラズモン共鳴センサー用チップ。

6. 基板の片側表面にスパッタリングまたは蒸着により金属薄膜を形成する工程と、前記金属薄膜の表面を化学修飾する工程と、前記化学修飾した基板を金属微粒子の溶液に浸漬する工程と、を含む、表面プラズモン共鳴センサー用チップの製造方法。

7. 基板の片側表面をアミノシランカップリング剤の溶液に浸漬する工程と、前記基板を金属微粒子の溶液に浸漬する工程と、前記基板を洗浄する工程と、

前記片側表面にスパッタリングまたは蒸着により金属薄膜を形成する工程と、
を含む、表面プラズモン共鳴センサー用チップの製造方法。

8. 請求項 1～5 のいずれか 1 項に記載の表面プラズモン共鳴センサー用チップと、
前記チップの前記金属層が形成されていない側に配置されたプリズムと、前記チップに前
記プリズムを介して光を照射する光源と、前記金属層による光の反射率を測定する光検出
器とを備えた表面プラズモン共鳴センサー。

9. (補正後) 請求項 1～5 に記載の表面プラズモン共鳴センサーチップを用いた測
定方法であって、

前記センサーチップの前記金属層側に試料溶液を接触させるステップと、

光学系から前記チップへ向けて、前記チップの金属層が形成されていない側から周波数
または入射角度が異なる光を照射するステップと、

前記金属層と前記基板との界面で全反射した光を光検出器で検出するステップと、

前記光検出器で検出した全反射光の強度から少なくとも 2 つの共鳴周波数または共鳴角
を求めるステップと、

前記 2 つの共鳴周波数または共鳴角の変化から、一方の共鳴周波数または共鳴角の変化
に基づく前記金属層の表面近傍における試料溶液の屈折率の変化と、他方の共鳴周波数ま
たは共鳴角の変化に基づく前記金属層の表面近傍外の試料溶液の屈折率の変化とを同時に
測定するステップと、

を含むことを特徴とする測定方法。

10. (補正後) 請求項 9 に記載の測定方法において、

前記試料溶液は生体分子を含んでおり、

前記センサーチップの前記金属層に受容体を固定するステップをさらに含み、

前記金属層の表面近傍における試料溶液の屈折率の変化に基づいて、前記生体分子と前
記受容体との相互作用の有無または程度を求める、
ことを特徴とする測定方法。

条約19条(1)に基づく説明書

請求の範囲第1項の補正は、金属層の表面に形成された凹部又は凸部の深さ又は高さの幅とがいずれも20 nm以上150 nm以下であることを明確にしたものである。

いずれの引用例にも、かかる数値限定は示されていない。

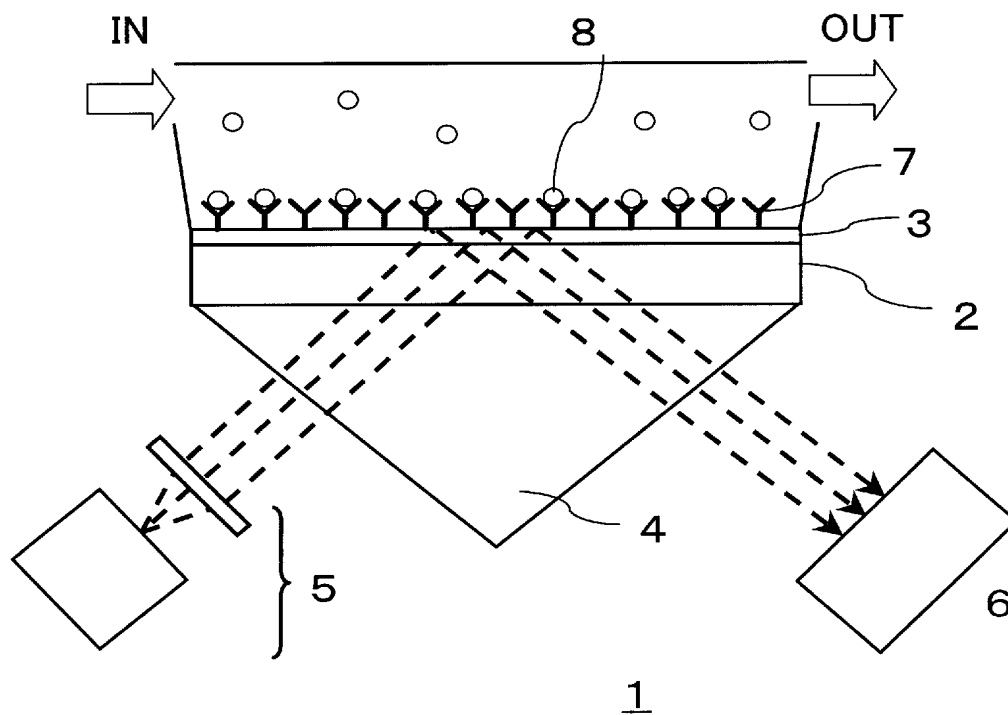
請求の範囲第9項の補正は、本発明の表面プラズモンセンサー用チップを用いた試料溶液の測定方法を明確にしたものである。

いずれの引用例にも、かかる測定方法は示されていない。

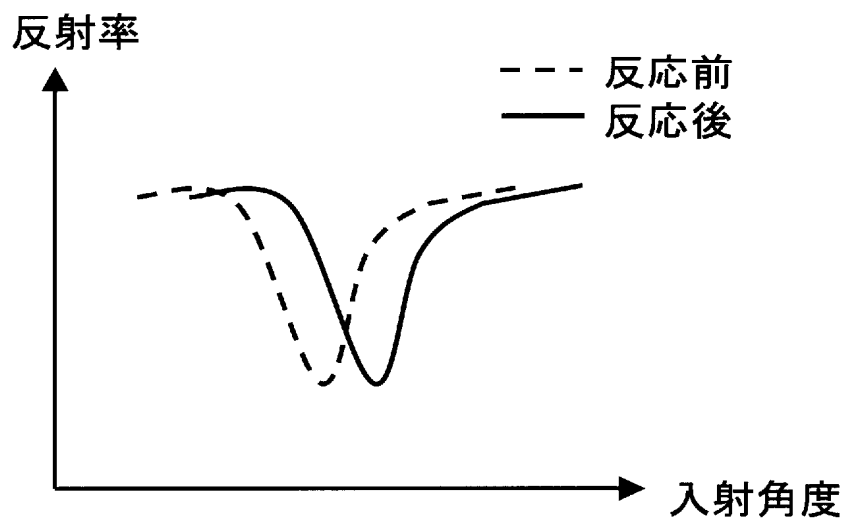
請求項範囲第10項の補正は、請求項9の測定方法において、さらに金属層に固定された受容体と試料溶液中の生体分子の相互作用を測定する点を明確にしたものである。

(以上)

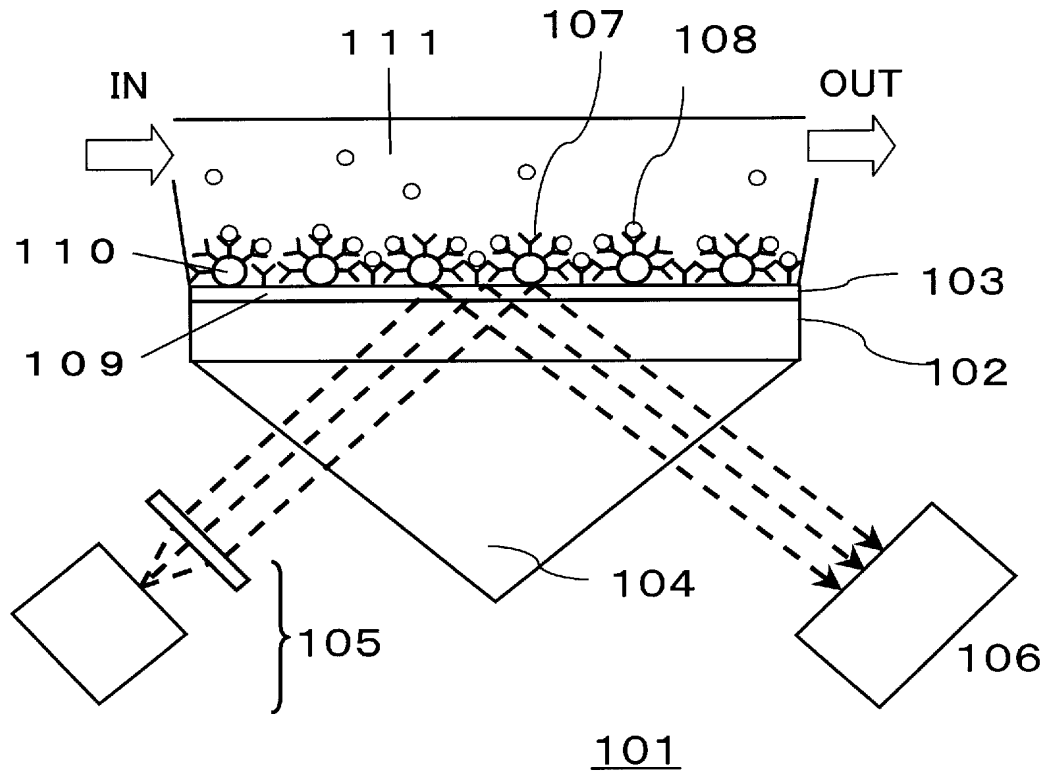
[図1]



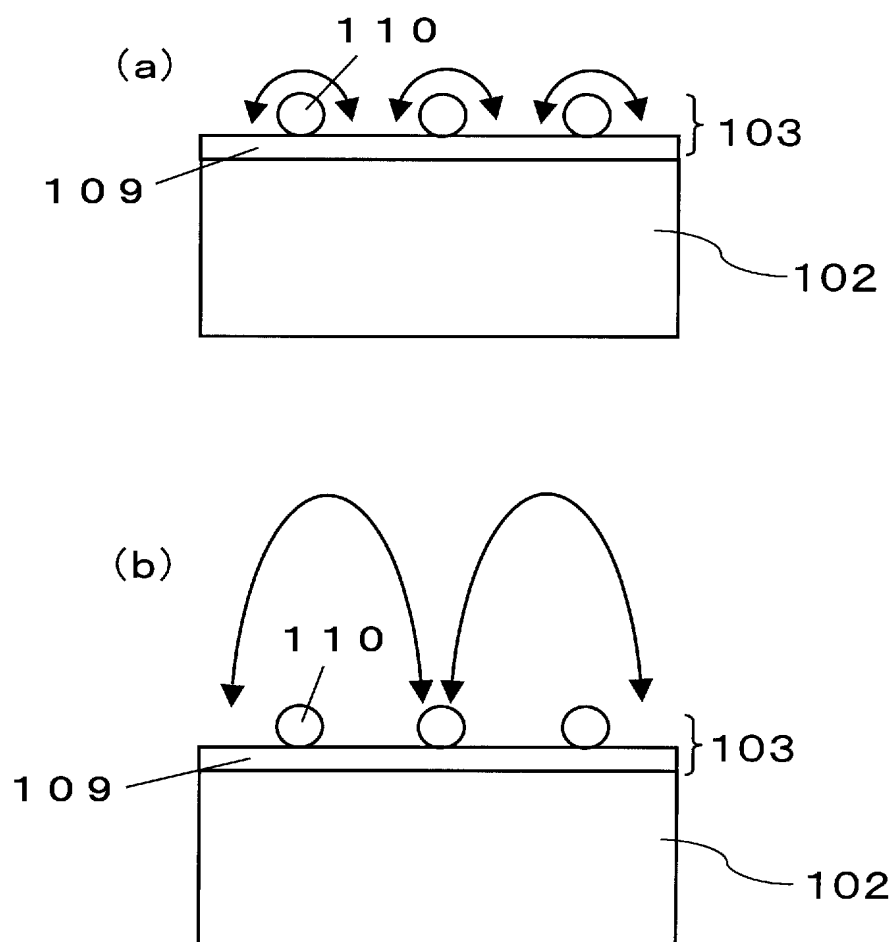
[図2]



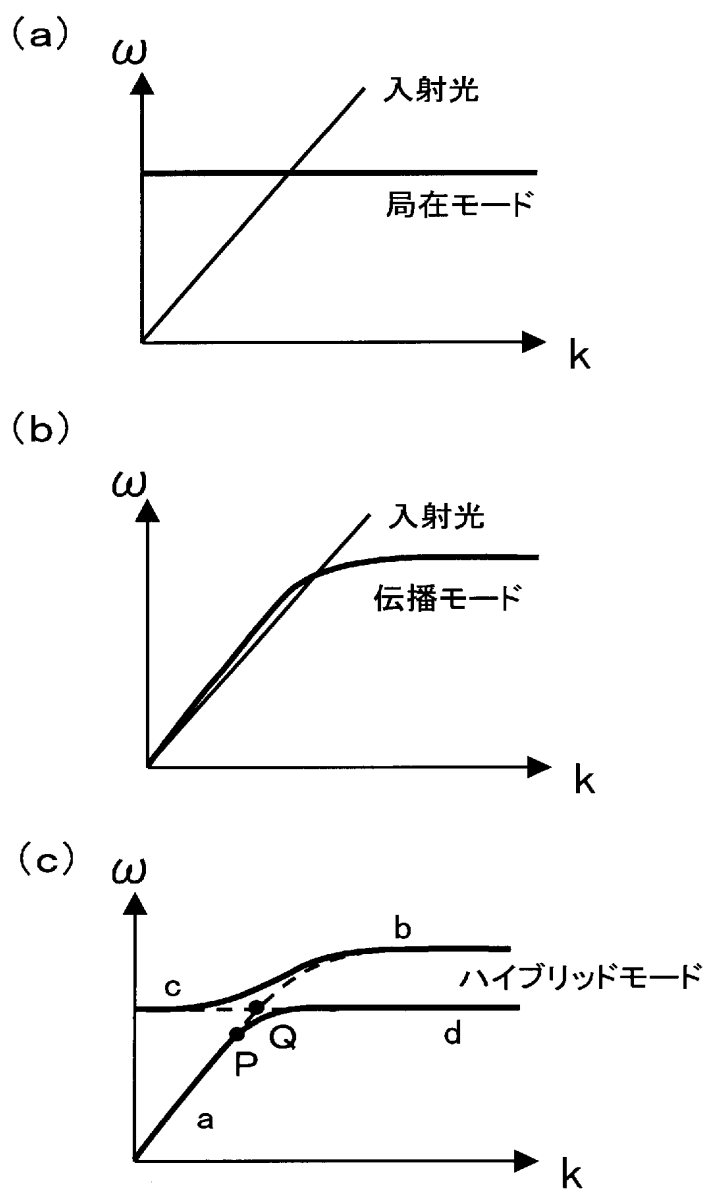
[図3]



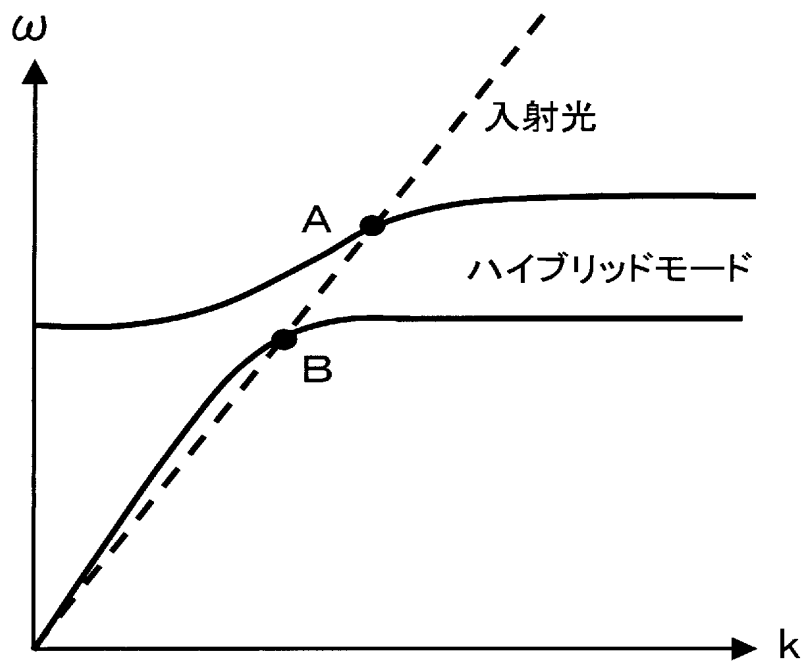
[図4]



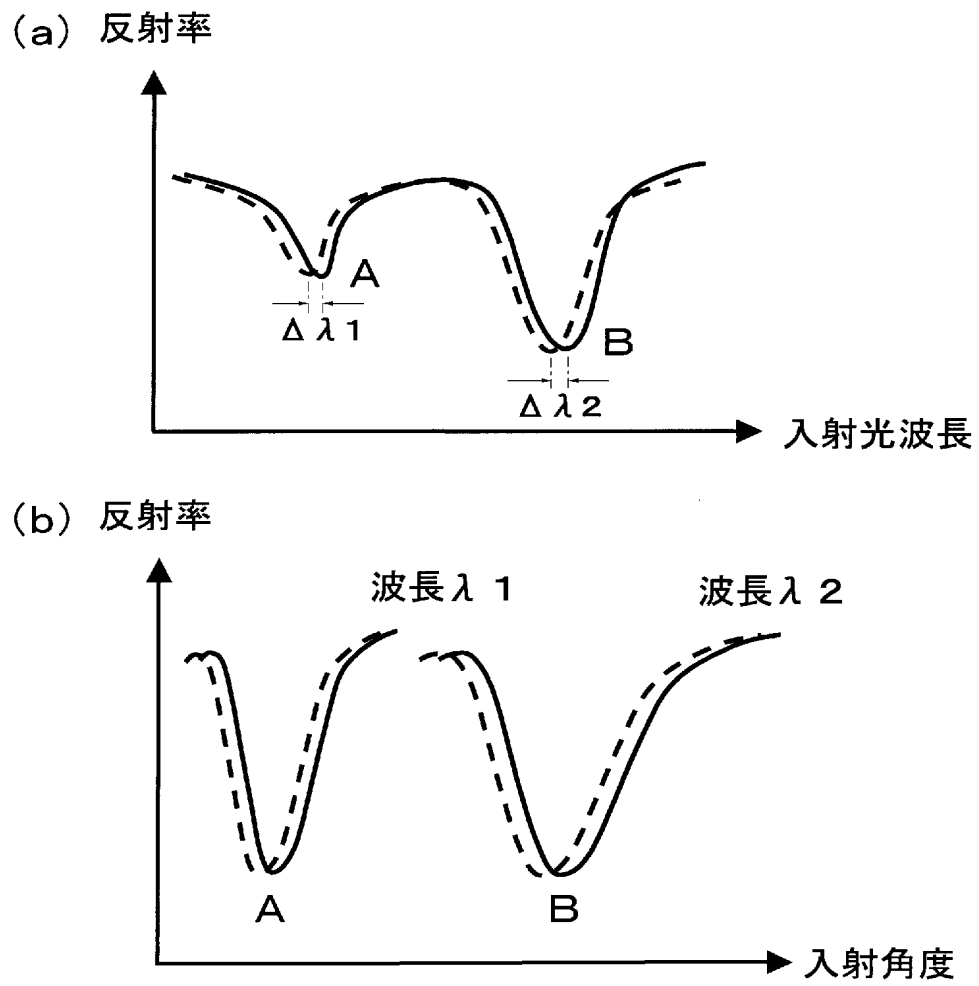
[図5]



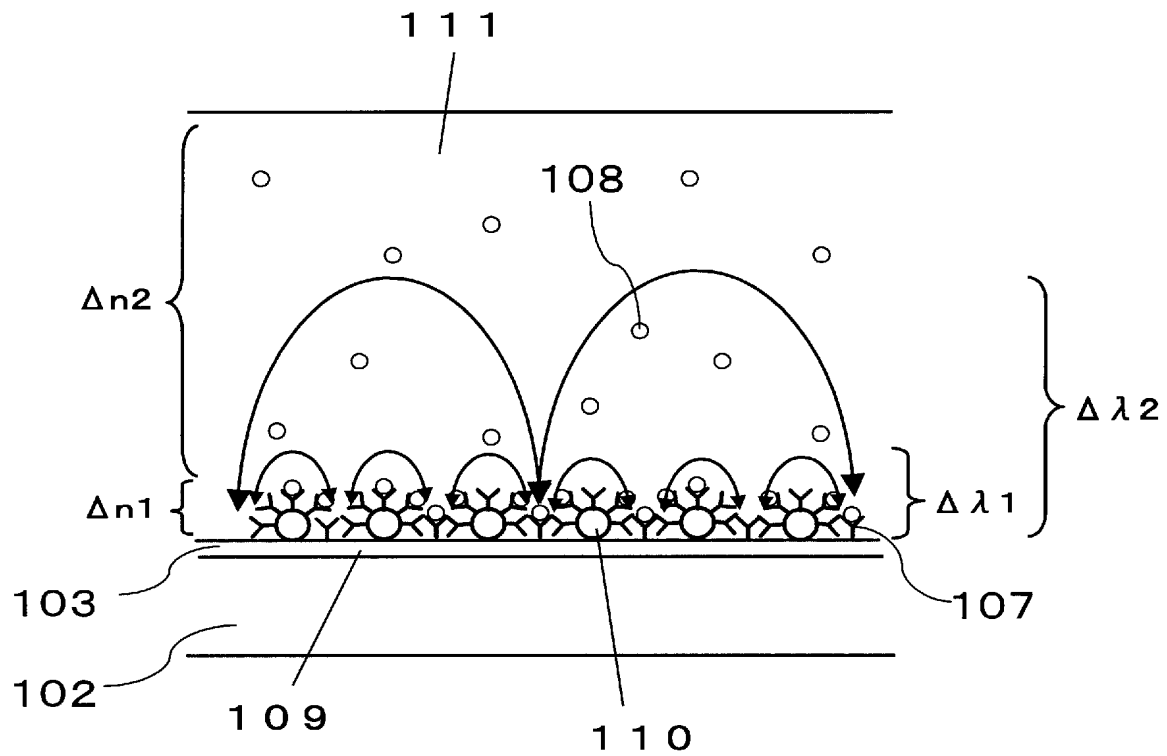
[図6]



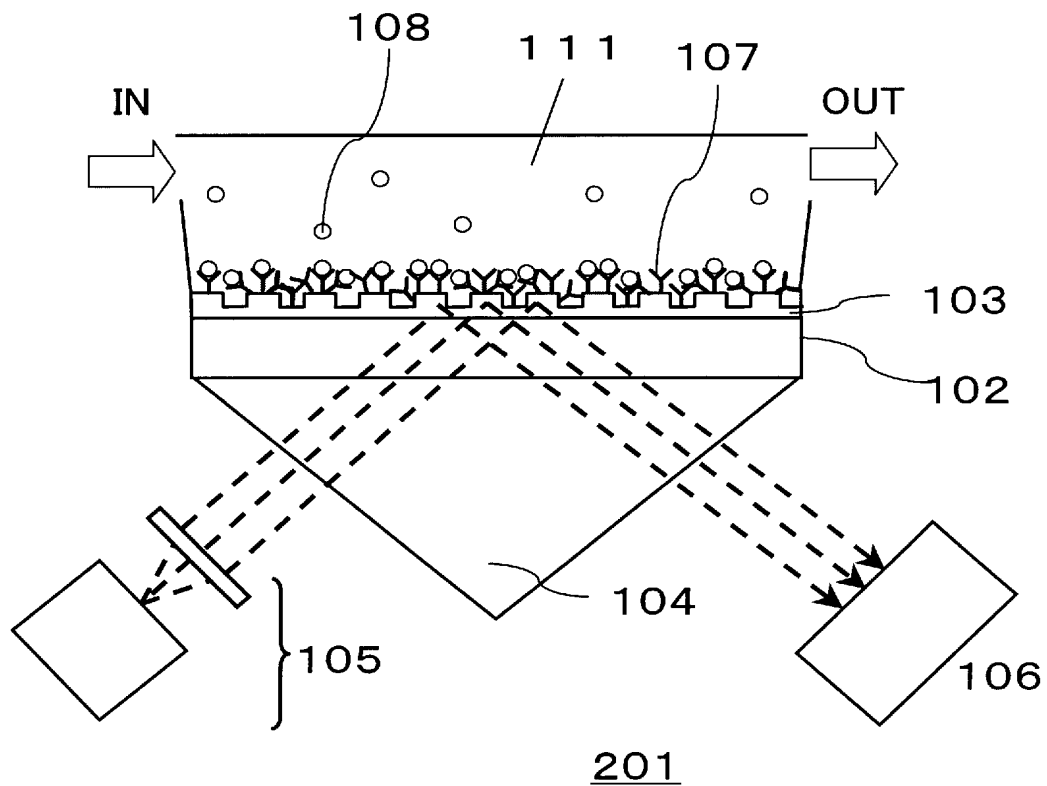
[図7]



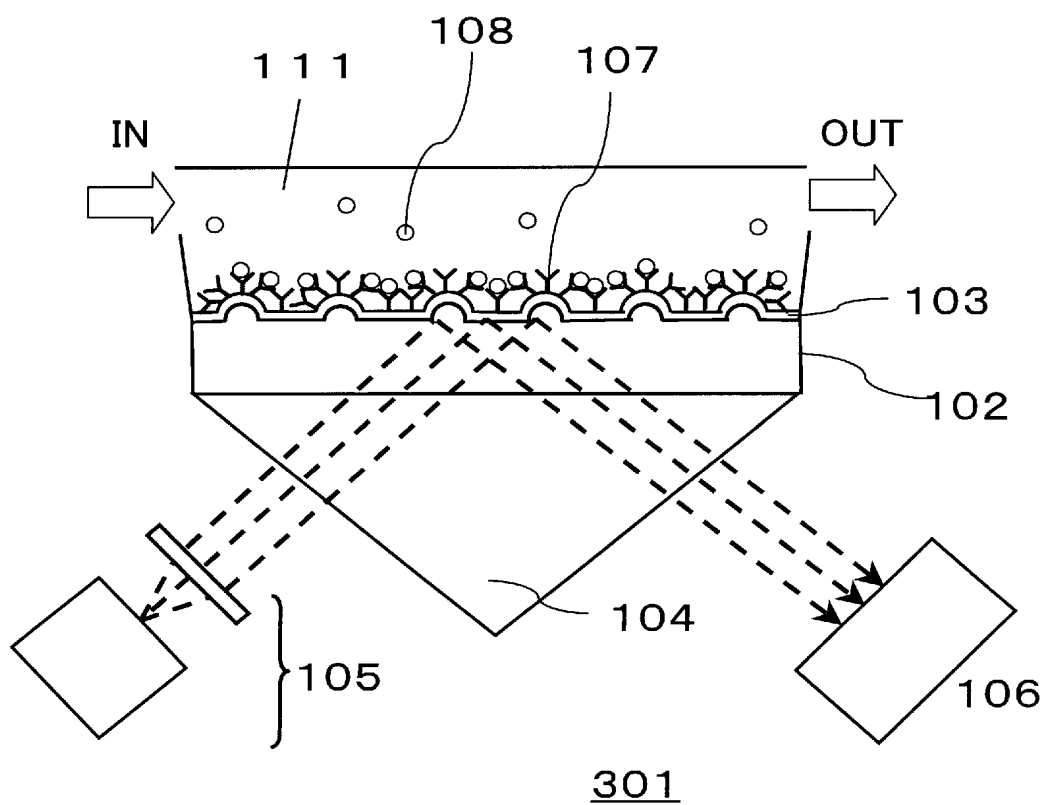
[図8]



[図9]



[図10]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/002045

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl.⁷ G01N21/55, G01N21/27

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl.⁷ G01N21/00-21/61, G01N21/62-21/74

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2005

Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2005 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2005

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

PATOLIS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
E, X	JP 2004-117181 A (Sharp Corp.), 15 April, 2004 (15.04.04), Full text (Family: none)	1, 3-5, 8, 10
E, X	JP 2004-239715 A (Fuji Photo Film Co., Ltd.), 26 August, 2004 (26.08.04), Full text (Family: none)	1, 4, 5, 8, 9, 10
E, X	JP 2004-245639 A (Fuji Photo Film Co., Ltd.), 02 September, 2004 (02.09.04), Full text (Family: none)	1, 2, 5, 10



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
25 February, 2005 (25.02.05)

Date of mailing of the international search report
15 March, 2005 (15.03.05)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/002045

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
E,X	JP 2004-239664 A (Fuji Photo Film Co., Ltd.), 26 August, 2004 (26.08.04), Full text (Family: none)	1,4,5,8,9,10
E,X	JP 2004-232027 A (Fuji Photo Film Co., Ltd.), 19 August, 2004 (19.08.04), Full text (Family: none)	1,2,5,8-10
E,X	JP 2004-309416 A (Sony Corp.), 04 November, 2004 (04.11.04), Full text (Family: none)	1,3,5,8,10
E,X	JP 2004-354130 A (Canon Inc.), 16 December, 2004 (16.12.04), Full text (Family: none)	1,5,9,10
E,X	JP 2005-16963 A (Canon Inc.), 20 January, 2005 (20.01.05), Full text (Family: none)	1,5,9,10
E,X	JP 2005-24483 A (Nippon Telegraph And Telephone Corp.), 27 January, 2005 (27.01.05), Fig. 3 (Family: none)	1,3,5,10
E,X	JP 2005-30905 A (Mitsubishi Chemical Corp.), 03 February, 2005 (03.02.05), Par. Nos. [0054] to [0056] (Family: none)	1,3-5,9,10
E,X	JP 2005-30906 A (Mitsubishi Chemical Corp.), 03 February, 2005 (03.02.05), Full text (Family: none)	1,3-5,9,10
E,X	JP 2005-49297 A (National Institute of Advanced Industrial Science and Technology), 24 February, 2005 (24.02.05), Full text (Family: none)	1,2,5,9,10
X <u>Y</u>	JP 2003-270132 A (Canon Inc.), 25 September, 2003 (25.09.03), Full text (Family: none)	1,5,10 <u>4,8,9</u>

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/002045

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 2003-121350 A (Mitsubishi Chemical Corp.), 23 April, 2003 (23.04.03), Full text (Family: none)	1, 3-5, 8-10
X	JP 2003-121349 A (Mitsubishi Chemical Corp.), 23 April, 2003 (23.04.03), Full text (Family: none)	1, 3-5, 8-10
X <u>Y</u>	JP 2002-365210 A (Hitachi, Ltd.), 18 December, 2002 (18.12.02), Full text (Family: none)	1-3, 5, 9, 10 <u>6, 7</u>
X <u>Y</u>	JP 2003-42947 A (Mitsubishi Chemical Corp.), 13 February, 2003 (13.02.03), Full text (Family: none)	1, 3-5, 9, 10 <u>8</u>
X	JP 2003-57173 A (Mitsubishi Chemical Corp.), 26 February, 2003 (26.02.03), Full text (Family: none)	1, 3-5, 9, 10
X	JP 2002-357543 A (Mitsubishi Chemical Corp.), 13 December, 2002 (13.12.02), Fig. 11; example 4 (Family: none)	1, 3-5, 9, 10
X	JP 2002-357537 A (Mitsubishi Chemical Corp.), 13 December, 2002 (13.12.02), Figs. 5, 7, 10 (Family: none)	1, 3-5, 8, 9, 10
X	JP 2003-14622 A (Mitsubishi Chemical Corp.), 15 January, 2003 (15.01.03), Full text (Family: none)	1, 3-5, 9, 10
X <u>Y</u>	JP 2003-14765 A (The Institute of Physical and Chemical Research), 15 January, 2003 (15.01.03), Full text (Family: none)	1, 2, 5, 9 <u>6, 7</u>
Y	JP 10-160737 A (Dainippon Printing Co., Ltd.), 19 June, 1998 (19.06.98), Full text (Family: none)	6, 7

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/002045

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 2001-149774 A (Japan Science and Technology Corp.), 05 June, 2001 (05.06.01), Par. No. [0002] (Family: none)	6, 7
Y	JP 2003-511666 A (Saromeddo Inc.), 25 March, 2003 (25.03.03), Full text & WO 01/25757 A	6, 7

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ G01N21/55 G01N21/27

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ G01N21/00-21/61 G01N21/62-21/74

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報 1922-1996年
 日本国公開実用新案公報 1971-2005年
 日本国登録実用新案公報 1994-2005年
 日本国実用新案登録公報 1996-2005年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

PATOLIS

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
E, X	JP 2004-117181 A(シャープ株式会社), 2004. 4. 15, 全文, (ファミリーなし)	1, 3-5, 8, 10
E, X	JP 2004-239715 A(富士写真フイルム株式会社), 2004. 8. 26, 全文, (ファミリーなし)	1, 4, 5, 8, 9, 10
E, X	JP 2004-245639 A(富士写真フイルム株式会社), 2004. 9. 2, 全文, (ファミリーなし)	1, 2, 5, 10
E, X	JP 2004-239664 A(富士写真フイルム株式会社), 2004. 8. 26, 全文, (ファミリーなし)	1, 4, 5, 8, 9, 10
E, X	JP 2004-232027 A(富士写真フイルム株式会社), 2004. 8. 19, 全文, (ファミリーなし)	1, 2, 5, 8-10
E, X	JP 2004-309416 A(ソニー株式会社), 2004. 11. 4, 全文, (ファミリーなし)	1, 3, 5, 8, 10
E, X	JP 2004-354130 A(キャノン株式会社), 2004. 12. 16, 全文, (ファミリーなし)	1, 5, 9, 10
E, X	JP 2005-16963 A(キャノン株式会社), 2005. 1. 20, 全文, (ファミリーなし)	1, 5, 9, 10

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
 「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

25. 02. 2005

国際調査報告の発送日

15. 3. 2005

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

樋口 宗彦

2W

9118

電話番号 03-3581-1101 内線 3290

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
E, X	JP 2005-24483 A(日本電信電話株式会社), 2005. 1. 27, 図3, (ファミリーなし)	1, 3, 5, 10
E, X	JP 2005-30905 A(三菱化学株式会社), 2005. 2. 3, 【0054】～【0056】, (ファミリーなし)	1, 3-5, 9, 10
E, X	JP 2005-30906 A(三菱化学株式会社), 2005. 2. 3, 全文, (ファミリーなし)	1, 3-5, 9, 10
E, X	JP 2005-49297 A(独立行政法人産業技術研究所), 2005. 2. 24, 全文, (ファミリーなし)	1, 2, 5, 9, 10
X <u>Y</u>	JP 2003-270132 A(キャノン株式会社), 2003. 9. 25, 全文, (ファミリーなし)	1, 5, 10, <u>4, 8, 9</u>
X	JP 2003-121350 A(三菱化学株式会社), 2003. 4. 23, 全文, (ファミリーなし)	1, 3-5, 8-10
X	JP 2003-121349 A(三菱化学株式会社), 2003. 4. 23, 全文, (ファミリーなし)	1, 3-5, 8-10
X <u>Y</u>	JP 2002-365210 A(株式会社日立製作所), 2002. 12. 18, 全文, (ファミリーなし)	1-3, 5, 9, 10, <u>6, 7</u>
X <u>Y</u>	JP 2003-42947 A(三菱化学株式会社), 2003. 2. 13, 全文, (ファミリーなし)	1, 3-5, 9, 10, <u>8</u>
X	JP 2003-57173 A(三菱化学株式会社), 2003. 2. 26, 全文, (ファミリーなし)	1, 3-5, 9, 10
X	JP 2002-357543 A(三菱化学株式会社), 2002. 12. 13, 図11・第4実施例, (ファミリーなし)	1, 3-5, 9, 10
X	JP 2002-357537 A(三菱化学株式会社), 2002. 12. 13, 図5, 7, 10, (ファミリーなし)	1, 3-5, 8, 9, 10
X	JP 2003-14622 A(三菱化学株式会社), 2003. 1. 15, 全文, (ファミリーなし)	1, 3-5, 9, 10
X <u>Y</u>	JP 2003-14765 A(理化学研究所), 2003. 1. 15, 全文, (ファミリーなし)	1, 2, 5, 9, <u>6, 7</u>
Y	JP 10-160737 A(大日本印刷株式会社), 1998. 6. 19, 全文, (ファミリーなし)	6, 7
Y	JP 2001-149774 A(科学技術振興事業団), 2001. 6. 5, 【0002】, (ファミリーなし)	6, 7
Y	JP 2003-511666 A(サロメット・インコーポレーテッド), 2003. 3. 25, 全文, &WO 01/25757 A	6, 7